



Dkt. #735-US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants : SHEN, et al.

U.S. Serial No.: 10/032,514 Examiner: Michele Flood

Filing Date : October 24, 2001 Art: 1654

FOR : COMPOSITION COMPRISING EXTRACTS OF FLOS  
LONICERAE, FRUCTUS FORSYTHIZE AND RADIX  
SCUTELIARIAE, USES AND PREPARATION THEREOF

Law Offices of Albert Wai-Kit Chan, LLC  
World Plaza, Suite 604  
141-07 20th Avenue  
Whitestone, New York 11357

October 28, 2003

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

**COMMUNICATION TO RE-SUBMIT PRIORITY DOCUMENT OF CN PATENT  
NO. 00125764.1, FILED OCTOBER 25, 2000**

Applicants claim priority of Foreign Application No. 00125764.1, filed on October 25, 2000 (a Chinese Patent) under 35 U.S.C. §119 in connection with the above-identified application.

Applicants filed a Communication in Response to July 15, 2003 Final Office Action and Submission of Priority Document of CN Application No. 00125764.1 on September 15, 2003. The USPTO did not receive the Priority Document. Hence, Applicants are hereby re-submitting the Priority Document as **Exhibit A**, a Certified Copy Chinese Patent No. 00125764.1, filed October 25, 2000.

If a telephone interview would be of assistance in advancing prosecution of the subject application, Applicants' undersigned attorney invites the Examiner to telephone him at the number provided below.

Applicants : SHEN, et al.  
U.S. Serial No. : 10/032,514  
Filing Date : October 24, 2001  
Page : 2

No fee is deemed necessary in connection with the filing of this Communication. However, if any additional fee is required, authorization is hereby given to charge the amount of any such fee to Deposit Account No. 50-1891.

Respectfully submitted,

Albert Wai-Kit Chan

Albert Wai-Kit Chan  
Registration No. 36,479  
Attorney for Applicants  
Law Offices of  
Albert Wai-Kit Chan, LLC  
World Plaza, Suite 604  
141-07 20<sup>th</sup> Avenue  
Whitestone, NY 11357  
Tel: (718) 357-8836  
Fax: (718) 357-8615  
e-mail: kitchanlaw@aol.com

# 证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2000 10 25

申 请 号： 00 1 25764.1

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 复方双黄连制剂及制备方法

申 请 人： 上海复星实业股份有限公司；国家中药制药工程技术研究中心

发明人或设计人：沈平孃；阮克锋；王玉兰；郁威；洪攸坤；张文清；王成荣

中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王 荣 川

2003 年 10 月 22 日

1、一种复方双黄连制剂，其特征在于该制剂是由金银花、连翘与黄芩的提取物作为活性成份与药用辅料组成的，并且按含活性成份为 0.01%~99.99%与含药用辅料为 99.99%~0.01%的任意配比制成 100% 的组成，其中活性成份为金银花+连翘浸膏 16.9~32 份，黄芩浸膏 5.6~75 份，金银花+连翘超临界提取物 0.56~19.6 份，辅料为 2.6~6.5 份。

2、一种如权利要求 1 所述的复方双黄连制剂的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

(1) 生药处方：金银花：连翘：黄芩=10%-60%:10%-80%:10%-60%

(2) 制备黄芩提取物：

黄芩切片，加 10 倍体积量的水煎煮三次，第一次 2 小时，第二，第三次各 1 小时，合并煎液，滤过，滤液浓缩至相对密度为 1.03~1.08(80℃测)的清膏，于 80℃用盐酸 (2mol/L) 调 pH 值至 1.0~2.0，保温 1 小时，静置 24 小时，滤过，沉淀用水洗至 pH 为 5.0，再用 70% 乙醇洗至 pH 7.0，低温干燥得提取物；

(3) 制备金银花+连翘的共提物：

A. 超临界提取金银花和连翘共提物

(a) 无夹带剂

将粉碎后的金银花和连翘的混合物放入提取罐，控制提取罐压力为 8.0~14.0MP，温度为 32~40℃，提取时间为 1~3 小时；提取金银花+连翘共提物；

(b) 用乙醇作夹带剂

将粉碎后的金银花和连翘的混合物放入提取罐，90~95% 乙醇加入量为二氧化碳用量的 10%~90%，控制提取管压力为 8.0~14.0MP，温度为 32~40℃，提取时间为 1~3 小时，回收乙醇后提取金银花+连翘共提物；

B. 亚沸态动态水提取及絮凝醇沉分离

(a) 将超临界提取后的金银花和连翘的混合物料，加水 10 倍量，在亚沸态 80~95℃，加搅拌，动态提取 1~3 小时。离心，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.1~1.3(70~80℃测)，冷置 50℃，加入絮凝剂 2g，搅拌 5 分钟，离心，浓缩至相对密度为 1.20~1.3(70~80℃测)，加入 90~95% 乙醇，使药液含醇量为 80~90%，放置冷却至室温，过滤，干燥得金银花+连翘的共提物；

(b) 采用絮凝和醇沉工艺相结合的分选纯化

实验条件为：絮凝剂加入量为：100g 生药中加入 0.5~3.5g

絮凝剂加入时，药液的比重 1.01~1.35

絮凝剂加入时温度：35~80℃

乙醇的浓度：70~95%

加入乙醇时药液的比重 1.1~1.3

(4) 制备成品：

金银花+连翘超临界提取物经过包埋后，加入黄芩浸膏、金银花+连翘浸膏，粉碎成细粉，混匀，制粒，干燥，整粒，加入常规药用辅料，压片，薄膜包衣，即得复方双黄连制剂。

3、一种如权利要求 2 所述的复方双黄连制剂的制备方法，其特征在于其中所述的超临界二氧化碳流体技术提取连翘和金银花挥发油时，压力为 8.0~14.0MP、温度为 32~40℃、时间 1~3 小时、药材粉碎细度为 20~60 目；在有夹带剂乙醇参与的二氧化碳超临界流体萃取技术提取连翘和金银花时，乙醇加入量为二氧化碳用量的 10~90%，压力为 8.0~14.0MP、温度为 32~40℃、时间 1~3 小时、药材粉碎细度 20~60 目。

4、一种如权利要求 2 所述的复方双黄连制剂的制备方法，其特征在于其中所述的当采用絮凝和醇沉工艺相结合的分离纯化时，絮凝剂加入量为 100g 生药中加入 0.5~3.5g；絮凝剂加入时，药液的比重 1.01~1.35；絮凝剂加入时温度 35~80℃；乙醇的浓度 70~95%，加入乙醇时药液的比重 1.1~1.3。

5、一种如权利要求 2 所述的复方双黄连制剂的制备方法，其特征在于其中所述的包埋技术为

(1).  $\beta$ -环糊精包埋技术

包结物制备方法—采用饱和水溶液法包结

精密称取  $\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -CD) (6.00g, 8.00, 10.00g) 置 150ml 具塞三角瓶中，按  $\beta$ -CD:  $H_2O$ —1: 6 的比例加入蒸馏水中，加热使溶解，降至一定温度，于磁力加热搅拌器上，用 1ml 的注射器将 1ml 挥发油缓缓注入  $\beta$ -CD 溶液中，加塞，搅拌至规定时间，置冰箱冷藏一定时间，过滤，收集包结物，在 60℃ 烘 2h，即得白色粉末状包合物；

此双黄连超临界提取物用  $\beta$ -环糊精包埋，包埋率可达 60%；

(2) 通过精密粒子设计，运用震动研磨，进行固液包埋制粒技术的研究，完成双黄连超临界提取物的包埋。

6、一种如权利要求 2 所述的复方双黄连制剂的制备方法，其特征在于其中所述的固体分散体制剂技术为将复方双黄连提取的浸膏粉、超临界制得的提取物与高分子载体混合后，用研磨法制备固体分散体，使三者形成氢键，制成固体分散体，再加入常规药用辅料，制粒，压片制得满足服用量的片剂，再薄膜包衣。

## 复方双黄连制剂及制备方法

本发明涉及中药制剂，具体涉及一种双黄连制剂及制备方法。

双黄连制剂系纯中药制剂，其主要成分为金银花、连翘、黄芩，具有清热解毒功效，早在 70 年代初已在中医临床应用，在 90 年代初，其一系列制剂包括粉针剂、水针剂、口服液、气雾剂、片剂等，获批准文号，但上述剂型还存在某些不足，例如水针剂存在着稳定性差的缺点；粉针剂则因技术要求高，生产周期长，生产上有相当难度；这两种针剂且易产生输液反应，所以限制了它们的使用。口服液除不稳定外，还存在成本高、携带不便等缺点。冲剂和片剂则有辅料量大，服用量大等缺点。同时各种制剂均无与国际接轨的、可控的质量标准。由于双黄连制剂属中医验方制剂，国外尚未见有关它的文献报道。

本发明的目的在于克服现有双黄连制剂的不足之处，采用现代先进技术，在制剂、工艺、质控方面改进和创新，开发有效成分相对稳定、质量可控，符合国际医药要求的中成药

本发明提供了一种复方双黄连制剂，该制剂是由金银花、连翘与黄芩的提取物作为活性成份与药用辅料组成的，并且按含活性成份为 0.01%~99.99%与含药用辅料为 99.99%~0.01%的任意配比制成 100%的组成，其中活性成份为金银花+连翘共提浸膏 16.9~32 份，黄芩提取物 5.6~75 份，金银花+连翘超临界共提物 0.56~19.6 份，辅料为 2.6~6.5 份。

本产品的药效学研究如下：

### 一、双黄连最佳化学组份配比的药效研究

#### 1. 抗病毒试验（体外抗流病毒试验）

##### 【实验材料】

受试药物：双黄连超临界提取部分，亚沸态水提取部分。

阳性对照药：病毒唑（三氮唑核苷），湖北省医药工业研究所产品，批号 980606；

病毒 流感病毒（A3）、副流感病毒—1 型（HVJ0）、单纯疱疹病毒—I、II 型（HSV-I、II）等分别购自中国预防医学科学院病毒学研究所及首都儿科研究所，经传代后保存于-70℃冰箱备用。

细胞 人喉癌传代细胞 Hep-2 株，购自卫生部药品生物制品检定所。

细胞培养液 Eagles MEM（日本日水制药株式会社出品）。

仪器 CO2 培养箱，美国 31-2700E 型。

倒置显微镜，OLYMPUS 生产的 IMT-2 型。

OLYMPUS BH-2 自动显微照相系统。

### 【方法与结果】

方法 Hep-2 株培养细胞毒性试验

方法 药液以 Eagles 培养液作倍比稀释，将 96 孔微量培养板已长成 Hep-2 细胞单层的培养液倒掉，加入不同稀释度的药液 100  $\mu$ l，每个稀释度药液各加入三孔细胞，同时设正常细胞对照。将培养板置 37℃，CO<sub>2</sub> 培养箱中培养三日，每日用倒置显微镜观察药液对细胞的影响，以细胞不出现退变的最小稀释度判为该药对细胞的无毒界限，利用 Reed—Muench 法计算 50% 毒性浓度 (CC<sub>50</sub>)。

结果 经过毒性试验选择 4 个稀释度对细胞生长无影响的药液，用于抗病毒试验。

病毒致细胞病变作用的影响

方法：取已长成单层细胞的培养板，接种 10 TCID<sub>50</sub> 的不同病毒液 50  $\mu$ l 于细胞孔，每一种病毒接种一个细胞板，置 37℃，CO<sub>2</sub> 培养箱中培养箱中吸附 1 小时，倒掉病毒液，用不含小牛血清的 Eagles 洗涤后，加入不同稀释度的药液 100  $\mu$ l。同时设病毒、药液、阳性对照药病毒唑、正常细胞对照。置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养三天，每日在倒置显微镜下镜检一次，观察细胞病变，连续三天。

结果 双黄连超临界提取部分对流感病毒和副流感病毒有较强抑制作用；亚沸态水提取部分对流感病毒、单纯疱疹病毒-I、II 型均有一定的抑制作用。

表 1 双黄连不同的提取部位抗病毒的药效作用

病毒	病毒唑	双黄连 50%有效浓度(EC <sub>50</sub> ) $\mu$ g / ml	
	125 $\mu$ g/ml	临界提取部分	水提取部分
A3	+	83.93(6.7)	236.6 (9.4)
HVJ	+	167.5(3.4)	-
HSV- I	+	-	561.2(4.0)
HSV- II	+	-	472.1(4.7)

## 2. 抗过敏试验

动物：三色豚鼠，南京医科大学动物中心，苏动（质）97001。

药物：受试样品 双黄连超临界提取部分、双黄连水提取部分；

马来酸氯苯那敏片，江苏鹏鹏药业有限公司，批号：990603. 1。

受试样品及马来酸氯苯那敏片均用台氏液溶解，使用前用混匀

器混匀。

方法：取豚鼠一只，击昏后取回肠段，悬挂于盛有台氏液的麦氏浴槽中，一端系在 L 型通气管上，加以固定，供给含 5%CO<sub>2</sub> 的氧气，另一端固定在压力换能器上预置负荷，浴槽温度对 37.5℃，稳定 1 小时，用 MacLab 进行描记。待自发节律恢复后。描记基线，然后开始用药。先加入组胺洗净，平衡至基线恢复正常后，再分别加入组胺和不同的受试样品溶液描记曲线。纪录组胺、组胺和药物的收缩曲线。按公式计算抑制 / 兴奋率 (%)。

$$\text{抑制 / 兴奋率 (\%)} = \frac{\text{正常平均波幅} - \text{用药后平均波幅}}{\text{正常平均波幅}} \times 100\%$$

## 5. 结论

组别	(浓度 g/ml)	抑制 / 兴奋率(%)
组胺	3.3x 10 <sup>-6</sup>	2.71 ± 0.42
组胺+马来酸氯苯那敏	3.3x 10 <sup>-6</sup> +1x10 <sup>-6</sup>	1.81 ± 0.32**
组胺+超临界提取部分	3.3x 10 <sup>-6</sup> +1x10 <sup>-6</sup>	2.23 ± 0.59*
组胺+水提取部分	3.3x 10 <sup>-6</sup> +1x10 <sup>-6</sup>	2.03 ± 0.96*

\* P<0.05, \*\* P<0.01, 与对照组相比。

由上表可见，双黄连临界提取部分、水提取部分有明显的对抗组胺引起的回肠收缩作用。

## 3. 抗炎试验(对白细胞运动的影响)

材料:

动物: 大鼠, 南京中医药大学动物房提供。

试剂: 甲酸三酞(FMLP), 用二甲基亚砷溶成 10mmol 浓度, 用时以 RPMI-1604 稀释。

药物: 超临界提取部分用二甲基亚砷溶解后面以 RPMI-1640 稀释, 甲基亚砷终浓度为 0.1%。

方法及结果:

琼脂糖微滴化学运动测定法:

(1)制备白细胞悬液: 取大鼠, 250+20g, 肝素抗凝, 加入 6%葡聚糖 1ml, 混匀, 静置, 吸取上清液, 离心, 弃上清。沉淀物用三羟甲基氨基甲烷—氯化铵缓冲液溶解残余的红细胞。白细胞成分田 RPMI-1640 液 (含小牛血清的 HEPES, 洗三次, 制成 10<sup>9</sup> / ml 白细胞悬液, 备用。

(2)琼脂糖 4mg, 加双蒸水 0.5ml, 放置沸水浴, 待其完全溶解后, 冷却至 37℃。与等体积的 RPMI-1640 混合, 取此混合液 0.1ml 与等量白细胞悬液; 充分混匀, 放 37℃备用。

(3)取 96 孔培养板, 用微量注射器抽取上述白细胞琼脂糖混合液



向每孔注入 2ul, 放 4℃ 冰箱 10 分钟, 待其凝固后, 分组, 分别为生理盐水、趋化剂、二甲基亚砷、受试药物 (各三个剂量)。

(4) 96 孔板 37℃ 孵育 4 小时; 在显微镜下用测微器测量白地胞移动距离。

计算出移动面积, 以 t 检验进行数据分析。

结果见下表。

表 2 双黄连对白细胞运动的影响

组别	剂量(mg/ml)	白细胞移动面积(mm <sup>2</sup> )
生理盐水	--	17.0 ± 11.1
甲酸三酐	5nM	229.2 ± 191.9 #
二甲基亚砷		159.6 ± 127.1 #
双黄连超临界提取部分	1	128.6 ± 147.9
	0.1	22.8 ± 27.2 △
	0.01	18.2 ± 11.9 △
双黄连水提取部分	1	27.5 ± 22.1 *
	0.1	28.1 ± 25.6 *
	0.01	11.9 ± 9.9 *

#P<0.05 与生理盐水组比较 \*P<0.05 与甲酸三酐比较

△ P<0.05 与二甲基亚砷比较

由上表可见, 双黄连临界提取部分、水提取部分有明显的抑制白细胞运动的作用, 白细胞游走与炎症反应密切相关, 提示双黄连具有抗炎作用。

## 二、新工艺与传统工艺的双黄连抗病毒药效研究比照

### □□ 1. 体外抗病毒试验

药物: 双黄连新工艺制剂25、26、27号;

双黄连对照片, 上海五洋药业健康产品有限公司生产, 批号: 990201;

病毒唑 (三氮唑核苷), 湖北省医药工业研究所产品, 批号: 980606。

#### (1) 对Hep-2培养细胞的毒性试验

方法。药液以Eaglé's 培养液作1: 4~1:512倍比稀释, 其余同前

结果 双黄连新工艺制剂25、26、27号和片剂对细胞的毒性试验CC<sub>50</sub>结果均为22.7 mg生药/ml, 选择5种稀释度对细胞生长无影响的药液, 用于抗病毒试验。

#### (2) 对病毒致细胞病变作用的影响

方法 同前。

结果 见表3。

表3 新工艺与传统工艺的双黄连对病毒致细胞病变作用比较

病毒	病毒唑	50%有效浓度 (EC <sub>50</sub> ) ug生药/ml, (IT)			
	125ug/ml	25	26	27	片剂
A <sub>3</sub>	+	4.7 (4.8)	4.7 (4.8)	3.3 (6.8)	4.7 (4.8)
HVJ	+	4.7 (4.8)	4.7 (4.8)	3.3 (6.8)	4.7 (4.8)
RSV	+	11.1 (2.0)	11.1 (2.0)	6.7 (3.4)	11.1 (2.0)
HSV-I	+	-	11.1 (2.0)	6.7 (3.4)	-
HSV-II	+	-	11.1 (2.0)	6.7 (3.4)	-

“+”为有效 “-”为无效。

26、27号对所试5种病毒均有一定的抑制作用，27号作用明显；23号和片剂作用相似，对仅对流感病毒A3、副流感I型和呼吸道合胞病毒显示抑制活性，病毒唑对5种病毒均有一定的抑制作用。

#### 2. 体内抗病毒试验---双黄连对小鼠流感病毒性肺炎的作用比较

□□□ 方法 取小鼠按体重随机分组，灌胃给予不同剂量的样品，病毒感染对照组和正常动物对照组均给相同药液容积的蒸馏水。除正常对照组外，将小鼠用乙醚轻度麻醉，以15个LD<sub>50</sub>流感病毒液滴鼻感染，每只0.05ml。从感染前一天开始给药或水，每天2次，连续5天，第6天称取小鼠体重后固定，放血、解剖，摘取全肺称重，逐个计算肺指数值，并求出肺指数抑制率。

□□□ 肺指数=肺重(g)/体重(g)×100

病毒对照组肺指数均值-试验组肺指数均值

肺指数抑制率%= $\frac{\text{病毒对照组肺指数均值}-\text{试验组肺指数均值}}{\text{病毒对照组肺指数均值}} \times 100\%$

病毒对照组肺指数均值

□□□ 肺指数值大，表示肺重量大，肺病变程度严重。将各组肺指数值进行t检验，比较组间差异性。

表4 双黄连对流感病毒性肺炎（肺指数）的影响比较

组别	剂量(g/kg)	鼠数(只)	肺指数值(X±SD)	抑制率(%)	P值
感染对照	--	10	1.54±0.25		
正常对照	--	10	0.91±0.07		<0.01
病毒唑	0.07	10	1.16±0.15	24.68	<0.01
双黄连片剂	33.0	10	1.27±0.19	17.53	<0.05
	16.5	8	1.33±0.17	13.64	>0.05
25号	33.0	10	1.33±0.13	13.64	<0.05
26号	33.0	10	1.33±0.18	13.64	<0.05
	16.5	10	1.36±0.18	11.69	>0.01
27号	33.0	10	1.25±0.21	18.83	<0.01
	16.5	8	1.32±0.20	14.28	<0.05

注: g/kg实际为g生药/kg。

结果 表4 结果可见, 感染后小鼠肺指数值明显增大, 双黄连片及双黄连不同工艺样品对流感病毒感染小鼠引起的肺炎均有不同程度的抑制作用, 肺指数值减小。

### 三、双黄连其它药效研究

#### 1. 对二甲苯所致小白鼠耳部炎症的影响

取健康雄性小白鼠 40 只, 体重 18—20g, 随机分为 4 组, 每组 10 只。分别 ig 双黄连片 1.44, 0.72g / kg; 容积 0.5ml / 20g, 空白组给等量生理盐水, 给药后每只小鼠左耳均匀涂布二甲苯 0.03ml 致炎, 3h 后断颈处死动物剪下耳壳, 用直径 9mm 打孔器取双侧耳对称处的耳片称重。以左右耳片重量之差表示肿胀度, 结果见表 5。

表 5 双黄连对二甲苯所致耳壳肿胀的影响

	剂量 (g / kg)	动物数 (只)	肿胀度 (mg, X±SD)	P
空白组	—	10	5.63±2.24	
双黄连片组	1.44	10	4.37±1.80	<0.05
双黄连片组	0.75	10	4.02±1.50	<0.05

结果表明, 双黄连片剂对二甲苯引的小鼠耳肿胀具有明显的抑制作用。

#### 2. 对大鼠足趾肿胀的影响:

取健康大鼠 50 只, 体重 180—250g 之间, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。各组用容积法先测量各组大鼠左右足趾容积作为正常值, 然后各组分别 ig 双黄连片 1.44, 0.72g / kg, 容积 10ml / kg, 空白组口服给等量生理盐水, 并在左右后肢足趾皮下注射器 10% 鲜蛋清 0.1ml 致炎, 给致炎剂后 0.5、1、2、4 小时分别再测量足趾容积, 计算各组肿胀度, 结果详见表 6。

表 6 双黄连片对大鼠足趾肿胀的影响

	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	肿胀 (ml, X±SD)				
			0.5h	1h	2h	3h	4h
空白组	—	10	0.63±0.18	0.66±0.17	0.57±0.16	0.52±0.16	0.37±0.03
双黄连片	1.44	10	0.51±0.17	0.45±0.14*	0.40±0.12*	0.37±0.02*	0.21±0.06*
双黄连片	0.72	10	0.53±0.19	0.48±0.16*	0.44±0.10*	0.41±0.09*	0.27±0.07

注: 与空白组比较 \* P<0.05 \*\* P<0.01

表 6 结果表明, 双黄连片对蛋清引起的大鼠足肿胀具有明显的抑制作用, 时间可达 4h 以上, 说明双黄连片剂具有较强的抗炎作用。

### 3、对家兔人工致热的影响:

取健康合格家兔 50 只, 体重 2.0—3.0kg, 雌雄兼取, 随机分为 5 组, 每组 10 只。家兔固定在箱内安静 1h 后, 测其正常体温, 每只家兔测二次正常体温 (间隔 30min), 取其二次体温平均值用为给药前动物正常体温。然后由耳缘静脉注射伤寒、副伤寒、甲、乙菌苗 1ml / kg, 立即分别 ig 双黄连片 1.0, 0.5g / kg, 容积为 2ml / kg, 空白组 水。给药后每隔 1 小时测定一次肛温, 共测 4 次, 记录注射致热剂后到 4 小时肛温, 根据给药后不同时间肛温, 进行各组肛温比较, 结果见表 7。

表 7 双黄连片对家兔人工致热的解热作用 (°C,  $\bar{X} \pm SD$ )

	剂量 g / kg	正 常 体 温	给药后体温减正常体温均值			
			1h	2h	3h	4h
空白组	—	38.94±0.30	0.90±0.36	1.16±0.32	0.83±0.30	0.51±0.23
双黄连片组	1	38.77±0.37	0.82±0.25	0.61±0.24**	0.47±0.11**	0.23±0.11**
双黄连片组	0.5	38.75±0.20	0.87±0.20	0.82±0.21*	0.57±0.24*	0.26±0.20*

注: 与空白组比较, \*P<0.05 \*\*P<0.01

实验结果, 双黄连有解热作用。在给药后 2h 即能见效。时间可维持 4h 以上。

### 小 结

双黄连主要药效学试验结果表明: 双黄连在体外抗病毒实验中, 超临界提取部分有明显的抑制流感病毒和副流感病毒; 水提取部分有抑制流感病毒和单纯疱疹病毒-I、II 型的作用; 双黄连新工艺的 27 号样品抗病毒作用强于传统工艺, 表明双黄连新工艺药物在体外感染实验中有较强的抗病毒作用, 是一种抗病毒谱比较广的中药; 双黄连临界提取部分、水提取部分有明显的对抗组胺引起的回肠收缩作用, 表明有抗过敏的作用; 双黄连同时还能显著降低伤寒、副伤寒甲乙三联菌苗致家兔体温的升高; 对二甲苯致小鼠耳壳炎症及蛋清引起的大鼠足趾炎症均有明显的抑制作用。

### 质量标准和质量控制:

#### 1. 中间体含量:

根据高压液相检测得金银花和连翘提取物中绿原酸、连翘甙含量分别为 1.0%~3.3%、0.2%~0.5% 黄芩提取物黄芩甙含量 90.0%~

92.8%。根据气相色谱法测得金银花+连翘的超临界共提物的  $\alpha$ -蒎烯的积峰面积为 100000~500000,  $\beta$ -蒎烯的积峰面积为 200000~1000000。

## 2. 成品质量:

根据高压液相色谱法检测双黄连成品制剂的含量为绿原酸、连翘甙、黄芩甙含量分别为 1.0%~1.8%, 0.1%~0.4%, 14.0%~15.8%。

3. 采用色谱——指纹谱技术, 建立了双黄连药材及制剂 HPLC-FPS, 提供了稳定可控的制剂指纹谱图, 结果证明成品中各药材的特征峰群与原药材吻合。

本发明的另一目的是提供了上述复方双黄连制剂的制备方法, 该方法包括下列步骤:

(1) 生药处方: 金银花: 连翘: 黄芩 = 10%-60%: 10%-80%: 10%-60%2

(2) 制备黄芩提取物:

黄芩切片, 加 10 倍体积量的水煎煮三次, 第一次 2 小时, 第二, 第三次各 1 小时, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.03~1.08(80℃测)的清膏, 于 80℃用盐酸 (2mol/L) 调 pH 值至 1.0~2.0, 保温 1 小时, 静置 24 小时, 滤过, 沉淀用水洗至 pH 为 5.0, 再用 70%乙醇洗至 pH 7.0, 低温干燥得提取物;

(3) 制备金银花+连翘的共提物:

A. 超临界提取金银花和连翘共提物

(a) 无夹带剂

将粉碎后的金银花和连翘的混合物放入提取罐, 控制提取罐压力为 8.0~14.0MP, 温度为 32~40℃, 提取时间为 1~3 小时; 提取金银花+连翘共提物;

(b) 用乙醇作夹带剂

将粉碎后的金银花和连翘的混合物放入提取罐, 90~95%乙醇加入量为二氧化碳用量的 10%~90%, 控制提取管压力为 8.0~14.0MP, 温度为 32~40℃, 提取时间为 1~3 小时, 回收乙醇后提取金银花+连翘共提物。

B. 亚沸态动态水提取及絮凝醇沉分离

(a) 将超临界提取后的金银花和连翘的混合物料, 加水 10 倍量, 在亚沸态 80~95℃, 加搅拌, 动态提取 1~3 小时。离心, 过滤, 滤液浓缩至相对密度 1.1~1.3(70~80℃测), 冷置 50℃, 加入絮凝剂 2g, 搅拌 5 分钟, 离心, 浓缩至相对密度为 1.20~1.3(70~80℃测), 加入 90~95%乙醇, 使药液含醇量为 80~90%, 放置冷却至室温, 过滤, 干燥得金银花+连翘的共提物;

(b) 采用絮凝和醇沉工艺相结合的分选纯化

实验条件为: 絮凝剂加入量为: 100g 生药中加入 0.5~3.5g

絮凝剂加入时，药液的比重 1.01~1.35

絮凝剂加入时温度：35~80℃

乙醇的浓度：70~95%

加入乙醇时药液的比重 1.1~1.3

#### (4) 制备成品：

金银花+连翘超临界提取物经过包埋后，加入黄芩浸膏、金银花+连翘浸膏，粉碎成细粉，混匀，制粒，干燥，整粒，加入常规药用辅料，压片，薄膜包衣，即得复方双黄连制剂。

上述方法中超临界二氧化碳流体技术提取连翘和金银花挥发油时，压力为 8.0~14.0MP、温度为 32~40℃、时间 1~3 小时、药材粉碎细度为 20~60 目；在有夹带剂乙醇参与的二氧化碳超临界流体萃取技术提取连翘和金银花时，乙醇加入量为二氧化碳用量的 10~90%，压力为 8.0~14.0MP、温度为 32~40℃、时间 1~3 小时、药材粉碎细度 20~60 目。

当采用絮凝和醇沉工艺相结合的分离纯化时，絮凝剂加入量为 100g 生药中加入 0.5~3.5g；絮凝剂加入时，药液的比重 1.01~1.35；絮凝剂加入时温度 35~80℃；乙醇的浓度 70~95%，加入乙醇时药液的比重 1.1~1.3。

#### 絮凝和醇沉工艺相结合的分离纯化技术描述

絮凝法是采用药用絮凝剂分离法。在混悬的中药水提液或浓缩液中加入少量絮凝剂，以吸附的方式除去溶液中的胶体颗粒，如蛋白质、果胶等，经过滤后达到精制和提高制剂成品质量的目的。絮凝法的基本原理：中药水提液中含有黏液质、蛋白质、淀粉、果胶等脂溶性、表面活性成分以及高分子等复杂成分，一起形成胶体，具有大的表面能，为热力学不稳定体系。当加入絮凝剂后，通过吸附架桥和电中和等作用沉降除去溶液中的粗粒子，以达到精制的目的。

醇沉方法是在中药水提液或浓缩液中加入 1~10 倍的酒精后，静置沉降，以除去溶液中的醇不溶物，再回收酒精并加水稀释至规定浓度，过滤后密封灭菌。醇沉法的基本原理：利用中药的部分有效成分既溶于水又溶于醇的性质，采用醇水液沉淀部分不溶于乙醇的物质，以达到精制成品，提高制剂成品质量的目的。

前者加入大量的酒精达到杂质沉降，产品精制的目的；后者加入少量的絮凝剂，使杂质颗粒聚集而沉降，同样达到精制的目的。

本课题采用絮凝和醇沉相结合的方法。在絮凝处理中，加入絮凝剂可通过吸附架桥和电中和作用除去药液中大部分的蛋白质、果胶、鞣质等胶体成分，而较好保留多糖以及有效成分。再通过醇沉处理，利用药液中的有效成分溶于醇又溶于水的性质，在醇水液中可沉降

除去药液中不溶于醇的成分，如多糖、剩余的壳聚糖絮凝剂等，使药液进一步纯化，去掉大量杂质，提高有效成分的含量。

上述制备中的包埋技术、固体分散体制剂技术如下：

### (1) $\beta$ -环糊精包埋技术

包结物制备方法—采用饱和水溶液法包结

精密称取  $\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -CD) (6.00g, 8.00g, 10.00g) 置 150ml 具塞三角瓶中，按  $\beta$ -CD:  $H_2O$  = 1: 6 的比例加入蒸馏水中，加热使溶解，降至一定温度，于磁力加热搅拌器上，用 1ml 的注射器将 1ml 挥发油缓缓注入  $\beta$ -CD 溶液中，加塞，搅拌至规定时间，置冰箱冷藏一定时间，过滤，收集包结物，在 60℃ 烘 2h，即得白色粉末状包合物。

此双黄连超临界提取物用  $\beta$ -环糊精包埋，包埋率可达 60%。

(2) 通过精密粒子设计，运用震动研磨，进行固液包埋制粒技术的研究，完成双黄连超临界提取物的包埋。

### 3、固体分散体制剂技术

将复方双黄连提取的浸膏粉、超临界制得的提取物与高分子载体混合后，用研磨法制备固体分散体，使三者形成氢键，制成固体分散体，再加入常规药用辅料，制粒，压片制得满足服用量的片剂，再薄膜包衣。

#### 实例 1、制备中间体

金银花 1125g

连翘 3375g

黄芩 3000g

制备方法：

1、黄芩切片，加水煎煮三次，第一次 2 小时，第二，第三次各 1 小时，合并煎液，滤过，滤液浓缩至相对密度为 1.03~1.08 (80℃ 测) 的清膏，于 80℃ 用盐酸 (2mol/L) 调 pH 值至 1.0~2.0，保温 1 小时，静置 24 小时，滤过，沉淀用水洗至 pH 为 5.0，再用 70% 乙醇洗至 pH 7.0，低温干燥，备用。

#### 2、超临界提取金银花和连翘共提物

##### (1) 无夹带剂

将粉碎后的金银花和连翘的混合物料放入提取罐，控制提取罐压力为 8.0~14.0MP，温度为 32~40℃，提取时间为 1~3 小时，产物得率为 0.1~3%。

##### (2) 用乙醇作夹带剂

将粉碎后的金银花和连翘的混合物料放入提取罐，乙醇加入量为二氧化碳用量的 10%~90%，控制提取管压力为 8.0~14.0MP，温度为 32~40℃，提取时间为 1~3 小时，回收乙醇，产物得率为 1~

3.5%。

### 3、亚沸态动态水提取及絮凝醇沉分离技术

(1) 将超临界提取后的金银花和连翘的混合物料，加水 10 倍量，在亚沸态 80~95℃，加搅拌，动态提取 1~3 小时。离心，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.1~1.3(70~80℃测)，冷置 50℃，加入絮凝剂 2g，搅拌 5min，离心，浓缩至相对相对密度为 1.20~1.3(70~80℃测)，加入乙醇，使药液含醇量为 80~90%，放置冷却至室温，过滤、干燥，得到 3~6%的产品。

(2) 采用絮凝和醇沉工艺相结合的分纯化方法

实验条件为：絮凝剂加入量为：100g 生药中加入 0.5~3.5g

絮凝剂加入时，药液的比重 1.01~1.35

絮凝剂加入时温度：35~80℃

乙醇的浓度：70~95%

加入乙醇时药液的比重 1.1~1.3

#### 实例 2、制备中间体

金银花 1875g

连翘 3750g

黄芩 1875g

制备方法同实例 1。

#### 实例 3、制备中间体

金银花 2625g

连翘 4500g

黄芩 375g

制备方法同实例 1。

#### 实例 4

金银花 1125g

连翘 3375g

黄芩 3000g

制备方法同实例 1。

#### 实例 5

金银花 1875g

连翘 3750g

黄芩 1875g

制备方法同实例 1。



## 实例 6

金银花	2625g
连翘	4500g
黄芩	375g

制备方法同实例 1。

## 实例 7、制备成品

处方：

金银花+连翘浸膏	169g
黄芩浸膏	56g
金银花+连翘超临界提取物	5.6g
微晶纤维素	20g
羧甲基淀粉钠	3g
硬脂酸镁	1g
滑石粉	1g
聚乙烯吡咯烷酮	1g

制备方法：

金银花+连翘超临界提取物经过包埋后，加入各料，粉成细粉，混匀，制粒，干燥，整粒，加入润滑剂，压片，薄膜包衣，即得。

## 实例 8、制备成品

处方：

金银花+连翘浸膏	225g
黄芩浸膏	56g
金银花+连翘超临界提取物	28g
微晶纤维素	43g
羧甲基淀粉钠	5g
硬脂酸镁	2.5g
滑石粉	2g
聚乙烯吡咯烷酮	2.5g

制备方法同实例 4。

## 实例 9、制备成品

处方：

金银花+连翘浸膏	320g
黄芩浸膏	75g
金银花+连翘超临界提取物	196g

微晶纤维素	51g
羧甲基淀粉钠	5.6g
硬脂酸镁	2.8g
滑石粉	2.8g
聚乙烯吡咯烷酮	2.8g
制备方法同实例 4。	

### 实例 10、制备成品

处方：

金银花+连翘浸膏	225g
黄芩浸膏	56g
金银花+连翘超临界提取物	28g
微晶纤维素	33g
羧甲基淀粉钠	6g
硬脂酸镁	1g
滑石粉	4g
PVP	11g

称取微晶纤维素、羧甲基淀粉钠等辅料置于研钵中混合。加入超临界提取物，高速研磨 15 分钟，再加浸膏粉置于振动研磨机中，高速研磨，使完成固液包埋过程，数分钟后，取出。加入 95%乙醇-水适量作湿润剂，制粒，颗粒过 16 目筛，置烘箱内温度控制于 55℃进行干燥。整粒，加硬脂酸镁润滑剂，压片，薄膜包衣。